

تهیه و شناسایی داروی فنوفیبرات بارگذاری شده در چارچوب های ایمیدازولی زئولیتی

و بررسی افزایش محلولیت دارو در فرمولاسیون ساخته شده

عزیز ملکی^{۱*}، زیبا اسلامبولچیلار^۲، رویا پورنوروز^۱، مهرداد حمیدی^۱، معصومه کرد^۴، محمد علی شهبازی^۱

^۱ مرکز تحقیقات نانو فناوری دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۲ گروه نانو فناوری دارویی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

^۳ گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴ مرکز تحقیقات نانو پزشکی تربیتا، شرکت تربیتا داروی هزاره سوم، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۲۱ تاریخ تصحیح: ۹۹/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۳۰

چکیده

داروی فنوفیبرات از کلاس دو سیستم تقسیم بندی بیوفارماسیوتیکال^۱ می باشد که محلولیت کمی در محیط آبی دارد. هدف از این مطالعه ساخت ترکیب میکروحفره متخلخل ZIF-8 (بعنوان یک عضو از خانواده ی بزرگ چارچوب های آلی -فلزی) و بارگذاری داروی فنوفیبرات در آن به منظور افزایش محلولیت فنوفیبرات می باشد. علاوه بر این مقایسه آزاد سازی داروی آزاد و داروی بارگذاری شده در ZIF-8 در دو محیط شبیه ساز معده^۲ (SGF) و روده (SIF)^۳ مورد بررسی قرار گرفته است. داروی فنوفیبرات و داروی بارگذاری شده در ZIF-8 توسط آنالیزهای جذب و واجذب نیتروژن، طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)^۴، آنالیز پراش اشعه ایکس (PXRD)^۵، میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)^۶ بررسی شده و همچنین پارامترهای مختلف از جمله شاخص تشابه (f₂)^۷، شاخص تفاوت (f₁)^۸، کارایی انحلال (DE)^۹ و میانگین زمان انحلال (MDT)^{۱۰} برای آزاد سازی دارو مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج این مطالعه نشان داد که سرعت انحلال فنوفیبرات بارگذاری شده در ZIF-8 نسبت به فرم آزاد دارو در دو محیط شبیه ساز معده و روده (بوئره معده) با افزایش قابل توجهی مواجه بود. مطالعات آزاد سازی و بررسی کینتیک آن نشان داد که آزادسازی دارو از ZIF-8 از مدل ویبول تبعیت می کند.

کلمات کلیدی: فنوفیبرات، سرعت انحلال، ZIF-8، چارچوب های ایمیدازولی زئولیتی.

¹ Biopharmaceutical Classification System (BCS) class II

² Enzyme-free simulated gastric fluid (SGF)

³ Enzyme-free simulated intestinal fluid (SIF)

⁴ Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)

⁵ Powder X-ray diffraction (PXRD)

⁶ Scanning electron microscope (SEM)

⁷ Similarity factor (f₂)

⁸ Difference factor (f₁)

⁹ Dissolution efficiency (DE)

¹⁰ Mean dissolution time (MDT)

۱-مقدمه

روش خوراکی متداول ترین، مناسب ترین، کم هزینه ترین و آسان ترین روش مصرف دارو می باشد. گزارش های اخیر نشان می دهد که حدود 40% داروها محلولیت کمی در محیط آبی از خود نشان می دهند و بسیاری از این داروها متعلق به کلاس دو بیوفارماسیوتیکال هستند که محلولیت آبی پایین و نفوذپذیری روده ای بالا دارند و از این رو سرعت انحلال در دستگاه گوارش مرحله محدود کننده سرعت جذب خوراکی این داروهاست که منجر به کاهش فراهمی زیستی و در نهایت منجر به نتایج بالینی نا کارآمد می شود (۱، ۲).

فنوفیبرات (Fen) جزو کلاس دو سیستم تقسیم بندی بیوفارماسیوتیکال بوده و عملاً نامحلول در آب بوده و دارای فراهمی زیستی خوراکی پایین ۳۶٪ می باشد و در درمان افزایش تری گلیسرید و کلسترول خون استفاده می شود. بنابراین میزان انحلال دارو در دستگاه گوارش میزان فراهمی زیستی خوراکی آن را تعیین می کند. این دارو به عنوان یک ماده تنظیم کننده چربی قادر به افزایش سطح لیپوپروتئین با چگالی بالا^{۱۱} (HDL) و کاهش لیپوپروتئین با چگالی کم^{۱۲} (LDL) و لیپوپروتئین با چگالی بسیار کم^{۱۳} (VLDL) می باشد علاوه بر این، باعث افزایش حذف LDL و کاهش LDL کوچک و متراکم می شود. با این حال، سرعت انحلال پایین این دارو منجر به فراهمی زیستی خوراکی پایین آن می شود. به خصوص هنگامی که به صورت خوراکی با معده خالی مصرف می شود، فراهمی زیستی کم بوجود می آید. بدین منظور و جهت از بین بردن محدودیت ها، تلاش های زیادی برای افزایش انحلال و فراهمی زیستی خوراکی فنوفیبرات با استفاده از سیلیکا، پلیمر آلی، کربن مزوحفره، لیپوزومها (۳) میکروامولسیونها (۴) و فرمولاسیون های بر پایه چربی انجام شده است.

مواد متخلخل دارای حفره های زیاد در ساختار خود هستند بنابراین حجم زیادی از ساختار آن ها را فضای خالی تشکیل می دهد. این مواد نسبت سطح به حجم بسیار بالا، نفوذپذیری یا تراوایی^{۱۴} زیاد، گزینش پذیری خوب و مقاومت گرمایی از ویژگی های مهم آن ها می باشد. طبق طبقه بندی IUPAC این مواد به سه دسته مواد میکرو حفره (قطر حفره کمتر از ۲ نانومتر)، ماکرو حفره (قطر حفره بیشتر از ۵۰ نانومتر) و مزوحفره (قطر حفره ۲ تا ۵۰ نانومتر) طبقه بندی می شوند. در این میان مواد مزوحفره سیلیکایی جزو مهمی از این طبقه بندی به حساب می آیند که اخیراً کاربرد بسیار زیاد در امر دارورسانی، به ویژه در بهبود محلولیت داروهای کلاس دو سیستم تقسیم بندی بیوفارماسیوتیکال داشته اند. در این مطالعه چارچوب های آلی-فلزی^{۱۵} که بعنوان بهبود دهنده های انحلال داروهای کم محلول استفاده خواهد شد، دارای مساحت بالا، تخلخل منظم و بالا و زیست سازگاری هستند

¹¹ High-density lipoprotein (HDL)

¹² low-density lipoproteins (LDL)

¹³ Very low-density lipoprotein (VLDL)

¹⁴ Permeability

¹⁵ Metal organic framework

و اندازه ذرات، میزان سطح و قطر حفره قابل تنظیم داشته که با استفاده از تجمع خودبخودی یون‌های فلزی و لیگاندهای آلی چند دندانه تولید شده در کاربردهای زیست پزشکی مورد توجه بسیاری قرار گرفته‌اند. بارگذاری قابل توجه داروها به همراه آزاد سازی تدریجی آنها باعث می‌شود مواد میکرو و مزو حفره در طراحی و ساخت سیستم‌های داروسان بسیار کارآمد باشند (۵).

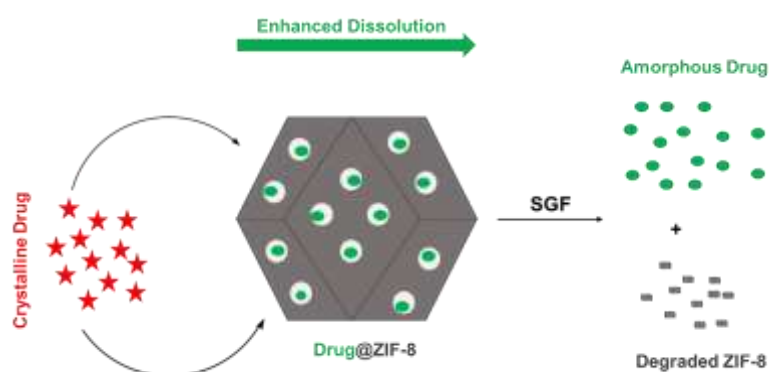
. با این وجود، علیرغم تحقیقات گسترده در مورد کاربرد حامل‌های دارویی در تجویز داخل وریدی، گزارشات بسیار نادری با استفاده از حامل‌های متخلخل از طریق تجویز خوراکی وجود دارد که همان طوری که بیان شد جزو ساده ترین و غیر تهاجمی ترین مسیرهای تجویز دارو است (۶، ۷). هورکاجادا^{۱۶} و همکارانش از MIL-127 به عنوان یک ماده جاذب سم زدایی خوراکی با پایداری فوق العاده در دستگاه گوارش که دارای ایمنی بالا بوده و نفوذپذیری کمی از روده داشت؛ استفاده کردند (۷). تثبیت انسولین بر روی کپسول‌های MOF (NU-1000) با پایداری در محیط اسیدی برای دارورسانی خوراکی انسولین توسط فرها^{۱۷} و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. بارگیری بالای انسولین (حدود ۴۰ درصد وزنی) و جلوگیری از تخریب انسولین در حضور اسیدهای معده و آنزیم پپسین از نتایج آن مطالعه بود.

چارچوب‌های ایمیدازولی زئولیتی به عنوان یک زیرخانواده مهم از شبکه های آلی فلزی می باشند که از تجمع یونهای Zn^{+2} و ۲-متیل ایمیدازول تهیه می شوند. هم‌چنین می‌توان از این خانواده هم ساختارهای گوناگون بسته به نوع فلز و ساختارهای متفاوت ایمیدازولی تهیه کرد. یکی از مهم‌ترین کاربردهایی که توسط ZIF-8 در امر دارورسانی انجام شده است، توانایی انکپسوله کردن داروها و آزادسازی آنها در یک محیط اسیدی می‌باشد. ZIF-8 جزء حامل‌های حساس به تغییرات pH می‌باشد. از خواص دیگر ZIF-8، حجم حفرات بالا و سطح مقطع بسیار بالا می‌باشد که همین مسئله باعث می‌شود که ZIF-8 در خانواده چارچوب های ایمیدازولی زئولیتی از اهمیت زیادی برخوردار باشد. مطالعات نشان داده است که این ترکیب در محیط آبی و بازی پایدار بوده ولی در محیط اسیدی شروع به تجزیه کرده و این واقعیت‌ها دلیل بر حساس بودن ZIF-8 به pH می‌باشد. این ماده بعنوان مثال در محیط اسیدی کامل حل شده و سمیت سلولی از خود نشان نمی دهد (۸).

در حال حاضر مثال‌های متعددی از کاربرد ترکیبات متخلخل در بهبود محلولیت داروی فنوفیبرات وجود دارد (۹). MCM-41 و SBA-15 به‌عنوان دو خانواده معروف از ترکیبات مزوحفره سیلیکایی برای افزایش سرعت و مقدار جذب داروی فنوفیبرات مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج این مطالعه نشان داده است که هردوی این مواد باعث افزایش مقدار محلولیت داروی فنوفیبرات در محیط آبی می‌شوند. علاوه بر این، این مطالعه نشان داد که افزایش قطر حفره این ترکیبات مزوحفره تاثیر بسزایی در بهبود محلولیت و فراهمی‌زیستی دارو دارد.

¹⁶ Horcajada¹⁷ Farha

در مطالعه حاضر، ZIF-8 به عنوان یک زیر خانواده از چارچوب های ایمیدازولی زئولیتی به منظور افزایش انحلال داروی کم محلول فنوفیبرات مورد مطالعه قرار گرفته است (شمای ۱). کاربرد این حامل ها در افزایش انحلال داروهای کلاس II تاکنون گزارش نشده است که در این مطالعه از پتانسیل های بالقوه این مواد از جمله تخلخل، مساحت سطح زیاد و همچنین زیست تخریب پذیر بودن این حامل ها در امر بهبود محلولیت داروی فنوفیبرات استفاده شده است. برای دستیابی به این هدف، پس از آماده سازی ZIF-8 داروی فنوفیبرات داخل حفرات آن بارگیری شده و فرمولاسیون حاصل با استفاده از آنالیز جذب و جذب نیتروژن، میکروسکوپ الکترونی روبشی، طیف سنجی مادون قرمز و آنالیز پراش اشعه ایکس مشخصه یابی شده و در نهایت، رفتار انحلال دارو در محیط شبیه ساز معده و روده مورد ارزیابی قرار گرفت.



شمای ۱: شمایی از بارگذاری داروی فنوفیبرات در حفرات ترکیب ZIF-8 و آزاد سازی دارو در محیط شبیه ساز معده به منظور افزایش محلولیت آن

۲- مواد و روش ها

نیترات روی شش آبه^{۱۸}، فنوفیبرات و ۲-متیل ایمیدازول از شرکت سیگما-آلد ریچ خریداری شد. برای تهیه بافر و کلیه آزمایشات از آب دیونیزه استفاده شد. سایر مواد شیمیایی از درجه خلوص بالا بوده و بدون هیچگونه خالص سازی مورد استفاده قرار می گرفت.

۲-۱- سنتز حامل ZIF-8

حامل ZIF-8 مطابق گزارش قبلی با اصلاح جزئی سنتز شد. به طور مختصر برای سنتز حامل ZIF-8، ۵۰ میلی لیتر محلول ۰/۵ مولار از ۲-متیل ایمیدازول^{۱۹} و ۵۰ میلی لیتر محلول ۰/۵ مولار از نیترات روی را در ۵۰ میلی لیتر متانول حل کرده سپس در دستگاه اولتراسونیک با دور ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و در نهایت رسوب تشکیل شده را جمع آوری کرده و سه بار با متانول شسته و جهت خروج حلال و خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در آون خلا قرار داده تا ZIF-8 با اندازه حفره حدود ۷/۰ نانومتر بدست آید.

¹⁸ Zinc nitrate hexahydrate

¹⁹ 2-methyl imidazole

بارگذاری فنوفیبرات در حامل ZIF-8 به روش تبخیر حلال انجام شد. به طور خلاصه، ۱۵ میلی گرم فنوفیبرات در ۶ میلی لیتر اتانول در دمای محیط حل شد. به محلول دارو، ۲۳ میلی گرم ZIF-8 اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۱۲ ساعت جهت تبخیر حلال در دمای محیط هم زده شد. فرمولاسیون حاصل یعنی Fen@ ZIF-8 در خلاء به مدت ۵ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد خشک شد. بدین ترتیب فنوفیبرات بارگذاری شده همچنین فرمولاسیون های مختلف از این سامانه دارویی با نسبت های Fen/ZIF-8=2/5 و Fen/ZIF-8=3/5 و Fen/ZIF-8=4/5 تهیه گردید.

تعیین مقدار فنوفیبرات با روش اسپکتوفتومتر در طول موج ۲۹۰ نانومتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و راندمان به دام افتادن دارو (LE) ^{۲۰} و ظرفیت بارگذاری (LC) ^{۲۱} با استفاده از رابطه های زیر محاسبه شد.

$$LC (\%) = \frac{\text{weight of Fen in nanoparticles}}{\text{Total nanoparticles weight}} \times 100$$

$$EE (\%) = \frac{\text{weight of Fen in nanoparticle}}{\text{Drug total weight}} \times 100$$

۲-۲- بررسی ویژگی های ساختاری ZIF-8 و Fen@ZIF-8

به منظور تصویر برداری نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، فرمولاسیون بهینه ابتدا با لایه ی نازکی از طلا پوشیده شده، سپس نمونه ی روکش داده شده در محفظه ی اصلی دستگاه قرار گرفته و آنالیز شد. عکس های لازم با بزرگنمایی های متناسب از نانوذرات تهیه گردید. طیف های تبدیل فوریه مادون قرمز توسط طیف سنج مربوطه ثبت شد (Tensor , Bruker , 27آلمان). طیف ها از ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ cm⁻¹ جمع آوری شد. الگوی پراش اشعه ایکس با استفاده از پراش اشعه ایکس ثبت شد. این الگو بیش از یک دامنه θ از ۲ تا ۵ درجه با اندازه پله ۰/۱۰۰ درجه در ثانیه جمع آوری شد. اندازه گیری جذب نیتروژن در جذب با دمای ۷۷ درجه سانتیگراد با استفاده از BELSORP-max, Nippon Bell, Japan انجام شد. مساحت سطح و توزیع اندازه منافذ به ترتیب با استفاده از آنالیز بورنر-امت-تلر^{۲۲} و میکروپور^{۲۳} تعیین شد. بررسی پتانسیل زتا توسط دستگاه نانوسایزر (Malvern Zetasizer Nano) انجام شد. بدین منظور نمونه ها ZIF-8, Fen@ZIF-8 با استفاده از اتانول رقیق شد. اندازه گیری ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با زاویه تفرق ۹۰ درجه انجام گرفت.

۲-۳- مطالعه آزاد سازی فنوفیبرات در دو محیط شبیه ساز معده و روده

مطالعه آزاد سازی دارو با استفاده از دستگاه شماره ۲ فارماکوپه آمریکا (Paddle) با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه انجام شد. برای تهیه محیط شبیه ساز معده، ۲ گرم سدیم کلرید و ۷ میلی لیتر هیدرو کلریدریک اسید ۳۷٪ با آب مقطر به حجم یک لیتر رسانده

²⁰ Entrapment Efficiency (EE)

²¹ Loading Capacity (LC)

²² Brunauer-Emmett-Teller (BET)

²³ Micropore Analysis

شد. بدین ترتیب محیط شبیه‌ساز معده بدون پیسین تهیه شد. برای تهیه محیط شبیه‌ساز روده، ۶/۸ گرم KH_2PO_4 در آب مقطر حل شده و با محلول سود ۱ مولار تنظیم pH شد. بدین ترتیب محیط شبیه‌ساز روده تهیه شد. با توجه به محلولیت آبی پایین فنوفیبرات، به هر یک از محیط‌های انحلال ۰.۲٪ وزنی-حجمی سدیم لوریل سولفات اضافه گردید. در ادامه داروی آزاد یا Fen@ZIF-8 (معادل ۵ میلی گرم فنوفیبرات) به ۹۰۰ میلی لیتر محیط انحلال در زمان صفر اضافه شد. دما در تمام مدت آزمایش در $37 \pm 2^\circ C$ ثابت نگه داشته شد. نمونه برداری در زمان‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ دقیقه انجام شد. در هر زمان ۱ میلی لیتر از محیط آزاد سازی خارج و با محیط تازه جایگزین شد تا حجم محیط انحلال تا انتهای آزمایش حفظ شود. آزاد سازی دارو در دو محیط شبیه ساز معده و روده انجام شد. نمونه‌های تهیه شده، پس از صاف شدن بلافاصله با دور ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و محلول رویی توسط دستگاه UV در طول موج ۲۹۰ نانومتر تعیین مقدار شد و نتایج به صورت میانگین گزارش شد.

کینتیک آزاد سازی داروی فنوفیبرات از ZIF-8 تهیه شده، با برازش داده‌های حاصل از آزاد سازی دارو بر مدل‌های کینتیکی درجه صفر، درجه یک، هیگوجی، درجه یک با Fmax، ویبول، Korsmeyer-Peppas، Hixson-Crowell و Hopfenberg بررسی شد.

برای مقایسه و بررسی میزان برازش داده ها به مدل‌های مختلف ضریب تعیین (R^2)، معیار ارزیابی آکایکه (AIC) یا Akaike Information Criterion و معیار انتخاب مدل (MSC) Model Selection Criterion بکار رفتند. برای محاسبه AIC از رابطه زیر استفاده شد:

$$AIC = n \cdot \ln(WSS) + n \cdot p$$

که در آن n تعداد نقاط داده، WSS مجموع مربعات وزن داده شده (weighted sum of squares) و p تعداد پارامترهای مدل است.

برای محاسبه MSC از رابطه زیر استفاده شد (۱۰):

$$MSC = \ln \left(\frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (y_{i_obs} - \bar{y}_{obs})^2}{\sum_{i=1}^n w_i \cdot (y_{i_obs} - y_{i_pre})^2} \right) - \frac{2p}{n}$$

در این معادله، w_i فاکتور وزن دهنده است که معمولاً برای برازش داده های انحلال ۱ در نظر گرفته می شود. y_{i_obs} مقدار ارزش y مشاهده شده i ام، y_{i_pre} مقدار ارزش y پیش بینی شده i ام، \bar{y}_{obs} میانگین تمام داده های y مشاهده شده، p تعداد پارامترهای مدل و n تعداد نقاط داده است.

مقایسه پروفایل‌های انحلال توسط فاکتور اختلاف (f_1)، فاکتور تشابه (f_2)، میانگین زمان انحلال (MDT) و راندمان انحلال (DE%) انجام گرفت (۱۱).

برای محاسبه فاکتور اختلاف (f_1) و فاکتور تشابه (f_2) از معادله های زیر استفاده می شود:

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \times 100 \right\}$$

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left(1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right)^{-0.5} \times 100 \right\}$$

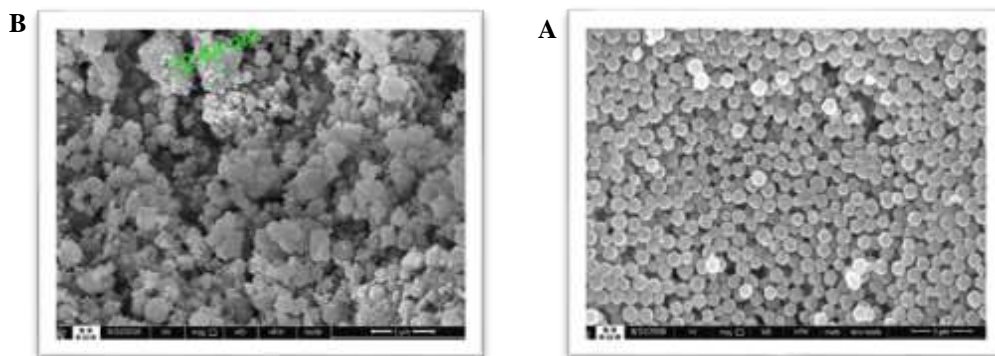
در این معادله ها n تعداد نمونه ها، R و T درصد فراورده رفرانس و تست انحلال یافته در زمان t است (۱۲).

- تجزیه و تحلیل داده ها

داده های حاصل از آزادسازی، کینتیک آزادسازی دارو از نانوذرات توسط نرم افزار Ddsolver آنالیز و گزارش گردید.

۴- بررسی ویژگی های نانوذرات ZIF-8 و Fen@ZIF-8

خصوصیات مورفولوژی نانوذرات بهینه قبل و بعد بارگذاری دارو توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). همان گونه که در شکل مشاهده می شود بعد از بارگذاری دارو، مورفولوژی ذرات به مقدار زیاد تغییر می کند. این مشاهده نشانگر بارگذاری دارو بر روی سطح نانوذرات ZIF-8 می باشد.

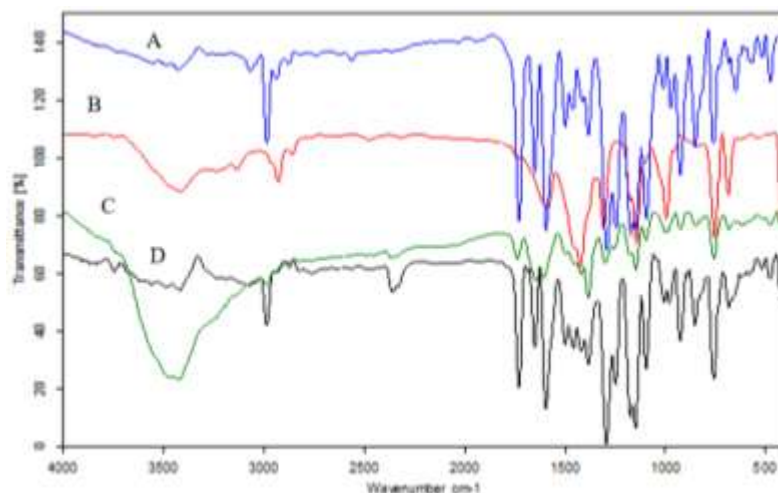


شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات ZIF-8 (A) و Fen@ZIF-8 (B)

طیف های مادون قرمز فنوفیبرات، ZIF-8، مخلوط فیزیکی آنها، و Fen@ZIF-8 در شکل ۲ نشان داده شده است. در طیف ZIF-8، نوار جذبی در ۱۵۸۳، ۱۶۰۶ و ۲۹۲۷ cm^{-1} را میتوان به ترتیب به کشش C-N، کشش C-C و کشش C-H آلیفاتیک از گروه ایمیدازول نسبت داد (۱۳).

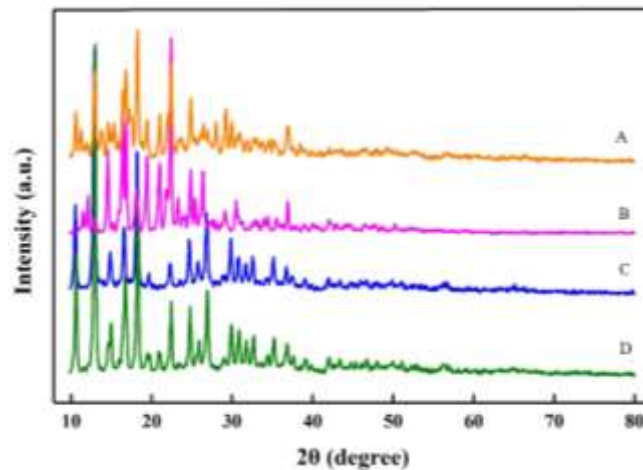
در طیف فنوفیبرات، نوار جذبی در ۱۶۵۰ و ۱۷۲۵ cm^{-1} نشان دهنده حضور دو گروه کربونیل کتون و استر است. نوار جذبی در ۲۸۰۰-۳۴۰۰ cm^{-1} همچنین نشان دهنده ارتعاشات کششی هیدروژن-کربن (C-H) است. همانطوریکه در شکل دیده می شود پیک های شاخص فنوفیبرات و ZIF-8 در Fen@ZIF-8 پهن یا ناپدید شده اند. نوار جذبی در ۲۸۰۰-۳۴۰۰ cm^{-1}

مربوط به کشش C-H از Fen در طیف Fen@ZIF-8 ناپدید شد. در مجمع این تغییرات در طیف FT-IR پس از جذب داروی فنوفیبرات در ZIF-8 ممکن است حاکی از برهم کنش های کئوردیناسیونی و یا پیوندهای هیدروژنی بین دارو و ZIF-8 باشد که می تواند نشان دهنده این باشد که دارو در داخل حفرات ترکیب ZIF-8 بارگذاری شده است.



شکل ۱: طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (A) مخلوط فیزیکی Fen و ZIF-8 (B)، ZIF-8 (C) Fen@ZIF-8 (D)، Fen استفاده از دستگاه پراش پرتو ایکس بطور وسیعی برای شناسایی حالت بلورین یک دارو در اکثر فرمولاسیون های دارویی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۱). وجود پیک های تیز در این نوع طیف ها نشانگر آن است که دارو در حالت بلورین قرار دارد در حالی که حذف این پیک های شاخص و یا ضعیف شدن آنها نشان می دهد که دارو از حالت بلورین خارج و به حالت آمورف تبدیل شده است. طیف های پراش پرتو ایکس فنوفیبرات، ZIF-8، مخلوط فیزیکی آنها و ZIF-8 حاوی دارو در شکل ۲ نشان داده شده است. مطابق شکل داروی آزاد فنوفیبرات در حالت بلورین قرار دارد. این مسئله توسط حضور پیک های زیاد و تیز در طیف آن قابل تأیید است. آنالیز پراش پرتو ایکس ZIF-8 که دارای پیک های بسیار تیز می باشد نیز به طور کامل با طیف های پراش پرتو ایکس گزارش شده در مطالعات قبلی سازگاری کامل دارد. این واقعیت تأیید می کند این ساختار بلوری با موفقیت سنتز شده است.

جالب توجه است که پس از بارگیری دارو پیک های شاخص ZIF-8 در فرمولاسیون Fen@ZIF-8 دیده می شود که نشان دهنده پایداری این ساختار متخلخل در اثر بارگیری دارو می باشد. در عوض هنگامی که داروی فنوفیبرات بر روی ZIF-8 جذب می شود پیک های شاخص دارو حذف می شوند. این واقعیت می تواند دلیل بسیار خوب جهت تبدیل حالت بلورین دارو به حالت آمورف قلمداد گردد. این تبدیل به حالت آمورف را می توان به برهمکنش های دارو با سطح حامل و همچنین انکپسوله شدن دارو در داخل منافذ ترکیب ZIF-8 نسبت داد. از طرف دیگر، برای مخلوط شدن فیزیکی ZIF-8 با داروی فنوفیبرات، پیک های مشخص دارو دوباره ظاهر شده که تأیید می کند دارو در حالت بلوری بوده و حامل هیچ تاثیری در بلور شدن آن ندارد (شکل ۳).



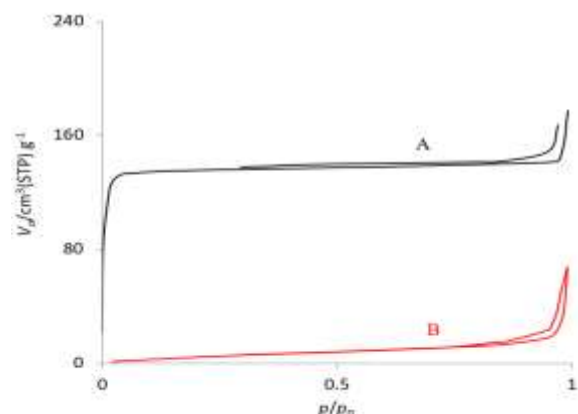
شکل ۲: طیف‌های PXRD (A) مخلوط فیزیکی ZIF-8 و فنوفیبرات ، (B) Fen ، (C) ZIF-8 ، (D) Fen@ZIF-8

یکی از آنالیزهای بسیار مهم که برای شناسایی ترکیبات میکروحفرات متخلخل مورد استفاده قرار می‌گیرد استفاده از روش تخلخل‌سنجی می‌باشد. با استفاده از این آنالیز می‌توان به مساحت سطح و حجم حفرات پی برد. علاوه بر این در اثر جذب مواد در داخل حفرات این ترکیبات باید مساحت سطح و حجم قابل دسترس از حفرات نیز کاهش یابد. نتایج آنالیز جذب و واجذب نیتروژن برای ترکیب ZIF-8 از سنتز موفق این ترکیب حکایت می‌کند. منحنی جذب و واجذب گرفته شده از ترکیب ZIF-8 با مشخصات ترکیبات میکروحفره هماهنگی دارد. مطابق طبقه‌بندی اتحادیه ی بین المللی شیمی محض و کاربردی (IUPAC)^{۲۴} ایزوترم موجود در شکل ۴ مخصوص ترکیبات میکروحفره بوده و ایزوترم نوع I می‌باشد. این درحالی است که بعد از جذب دارو بر روی ترکیب ZIF-8 ایزوترم نوع I از بین رفته و ایزوترم جدید تولید شده که مشخصه ترکیبات بدون حفره می‌باشد. این مشاهده نیز بارگیری موفق دارو بر روی سطح حامل را نشان می‌دهد. آنالیز تخلخل‌سنجی هم‌چنین نشان داد ترکیب ZIF-8 مساحت سطح برابر با $405/75 \text{ m}^2/\text{g}$ دارد. هنگامی که بارگیری دارو و فنوفیبرات بر روی سطح ZIF-8 انجام شد، نتایج تخلخل‌سنجی نشان داد که مساحت سطح به عدد $14/92 \text{ m}^2/\text{g}$ کاهش پیدا می‌کند که این مشاهده نیز نشان‌دهنده‌ی انباشت دارو در داخل حفرات این ماده می‌باشد (جدول ۱). علاوه بر این کاهش پتانسیل زتا از $+1/53$ به $-0/10$ نیز بیانگر انباشت دارو روی سطح و درون حفرات می‌باشد.

جدول ۱. خواص ساختاری و اندازه گیریهای پتانسیل زتا ترکیب ZIF-8 قبل و بعد از بارگذاری داروی فنوفیبرات

نمونه	مساحت سطح (m^2/g)	قطر حفره (nm)	حجم حفره (cm^3/g)	پتانسیل زتا (mV)	درصد بارگذاری دارو
ZIF-8	405/75	0/7	0/26	+1/53	-
Fen@ZIF-8	14/92	-	0/09	-0/10	٪28/56

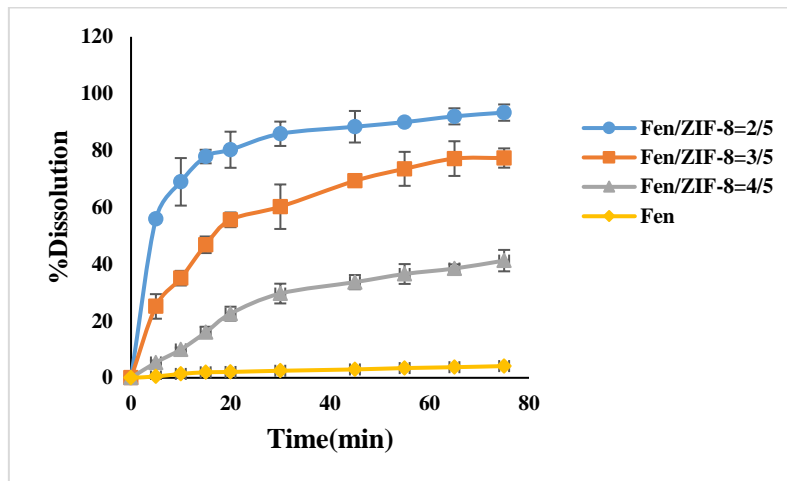
²⁴ International Union of Pure and Applied Chemistry) IUPAC)



شکل ۳: ایزوترم جذب/واذب نیتروژن ZIF-8 (A)، Fen@ZIF-8(B)

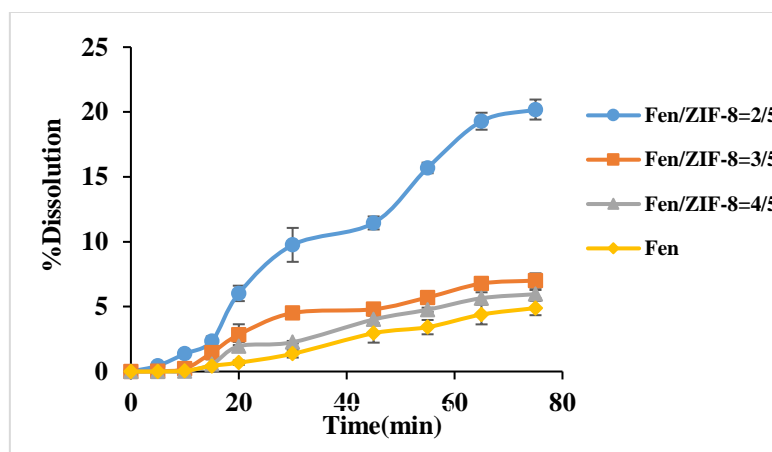
۵- مطالعه آزادسازی داروی فنوفیبرات از Fen@ZIF-8 در محیط شبیه ساز معده و روده

انحلالیت داروی فنوفیبرات در حضور ترکیب میکرو حفره ZIF-8 در محیط شبیه ساز معده با داروی آزاد مورد مطالعه قرار گرفت (شکل ۴). همانطوری که از الگوی آزاد سازی این دو سیستم مورد بررسی پیداست، در حضور ZIF-8 به عنوان حامل دارویی محلولیت فنوفیبرات در سامانه دارورسانی Fen@ZIF-8 در محیط شبیه ساز معده نسبت به داروی آزاد چندین برابر افزایش پیدا می کند. بطوری که در نسبت $Fen/ZIF-8=2/5$ در همان ۵ دقیقه اول حدود ۶۵٪ دارو رها می شود. این در حالی است که تنها حدود ۳٪ داروی آزاد توان حل شدن در این محیط را پیدا می کند. این مشاهده به طور کامل قدرت میکرو حفرات را در بهبود انحلالیت این دارو را نشان داده و همچنین تبدیل دارو از حالت بلورین به حالت آمورف را ثابت می کند که انحلالیت آن به مراتب بسیار بالاتر از داروی بلورین می باشد. همانطوری که در بخش های قبل نیز بیان شد این واقعیت در آنالیزهای پراش پرتو ایکس این سامانه دارورسانی نیز ثابت گردید. علاوه بر این همان طوری که در شکل ۶ مشاهده می شود مناسب ترین فرمولاسیون، نسبت $Fen/ZIF-8=2/5$ است که بیشترین محلولیت داروی فنوفیبرات را از خود نشان می دهد، به طوری که بعد از حدود ۴۰ دقیقه میزان محلولیت آن به حدود ۹۵٪ رسیده است. هم چنین هرچه نسبت دارو به ZIF-8 افزایش پیدا می کند درصد انحلال دارو کاهش پیدا می کند. این موضوع احتمالاً به این دلیل است که در غلظت های پایین دارو فیلم نازکی از دارو به صورت آمورف بر روی سطح ZIF-8 تشکیل می گردد که هنگامی که در محیط شبیه ساز معده قرار می گیرد با سرعت حل می شود. در مقابل هنگامی که میزان دارو بر روی سطح افزایش می یابد، به احتمال بالایی کم کم داروی بلورین بر روی فیلم نازک آمورفی تشکیل شده و دوباره باعث کاهش انحلال می گردد. این مسئله به ویژه هنگامی که میزان داروی بارگیری شده بیشتر و بیشتر می گردد، مشهودتر شده و سرعت انحلال کاهش زیادتری به خود می گیرد (شکل ۶).



شکل ۴: منحنی آزادسازی فنوفیبرات با نسبت‌های متفاوت از ZIF-8 در محیط شبیه ساز معده

مطالعات آزادسازی فنوفیبرات از Fen@ZIF-8 در محیط شبیه ساز روده نیز نشان داد هم محلولیت داروی آزاد و هم داروی بارگذاری شده در حامل ZIF-8 نسبت به محیط شبیه ساز معده در کل کمتر می‌باشد (شکل ۷). همچنین داروی آزاد در محیط روده محلولیت بسیار کم‌تری نسبت به داروی بارگذاری شده در حامل ZIF-8 دارد. به طوری که به عنوان مثال پس از گذشت ۳۰ دقیقه انحلال داروی آزاد فنوفیبرات حدود ۱ درصد و انحلال داروی بارگذاری شده در حامل ZIF-8 حدود ۱۰ درصد می‌باشد. مطابق شکل نسبت‌های مختلف از فرمولاسیون Fen@ZIF-8 رفتارهای متفاوتی از لحاظ سرعت انحلال باهم دارند. بدین صورت که نسبت Fen/ZIF-8=2/5 محلولیت مناسب‌تری نسبت به بقیه فرمولاسیون‌ها دارد. مشابه نتایج به دست آمده در محیط شبیه ساز معده با افزایش مقدار داروی بارگذاری شده فنوفیبرات بر روی سطح ZIF-8 میزان انحلال دارو دوباره کاهش پیدا می‌کند که باز این موضوع می‌تواند به کریستاله شدن دارو بر روی سطح در نسبت‌های بیش‌تر دارو ارتباط داده شود.



شکل ۷: منحنی آزادسازی فنوفیبرات با نسبت‌های متفاوت از ZIF-8 در محیط شبیه ساز معده شبیه ساز روده

۶- مطالعه کینتیک آزاد سازی دارو

برای مطالعه آزاد سازی دارو از ماتریکس های Fen@ZIF-8 در محیط شبیه ساز معده، داده های انحلال حاصل از فرمولاسیون Fen@ZIF-8 و داروی آزاد فنوفیبرات با هشت مدل ریاضی بررسی شد. مدل های دارای بالاترین مقادیر R^2 ، MSC و همچنین کمترین مقدار AIC به عنوان بهترین مدل انتخاب شدند (جدول ۱۱) (۱۴). مطالعات آزاد سازی و بررسی کینتیک با مقایسه فاکتورهای مربوط به برازش (R^2 , MSC, AIC) نشان داد که آزادسازی دارو از ZIF-8 از مدل امپریکی ویبول بیشترین میزان پیروی را دارد.

پارامترهای مختلف از جمله ضریب تشابه (f_2)، ضریب تفاوت (f_1)، کارایی انحلال (DE%) و میانگین زمان انحلال (MDT) برای آزاد سازی دارو مورد بررسی قرار گرفت. شاخصهای f_1 و f_2 بمنظور مقایسه دو پروفایل محاسبه می گردد. از آنجایی که شاخص f_1 به عنوان معیاری برای نشان دادن تفاوت میان دو پروفایل می باشد، کوچک بودن مقدار آن نشانگر شباهت بیشتر میان دو پروفایل مورد بررسی می باشد. معمولاً مقادیر بین ۰ تا ۱۵ به عنوان محدوده قابل قبول برای نتیجه گیری در خصوص شباهت دو پروفایل پیشنهاد می گردد. همچنین از شاخص f_2 به عنوان معیاری برای نشان دادن شباهت میان دو پروفایل استفاده می شود و بزرگ بودن مقدار این شاخص، شباهت بیشتر میان دو پروفایل را نشان می دهد. معمولاً مقادیر بین ۵۰ تا ۱۰۰ به عنوان محدوده قابل قبول برای شبیه دانستن دو پروفایل مورد استفاده قرار می گیرد تفاوت پروفایل آزادسازی دارو بین فرمولاسیون Fen@ZIF-8 در مقایسه با داروی بلوری فنوفیبرات، با محاسبه شاخص تفاوت f_1 و شاخص تشابه f_2 بین پروفایل های آزاد سازی مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است، مقدار f_1 بیشتر از ۱۵ و مقدار f_2 برابر ۶/۰۹ بوده که عددی زیر ۵۰ می باشد. بنابراین، می توان نتیجه گرفت که روند انحلال Fen@ZIF-8 با داروی بلوری تفاوت دارد. در عین حال جهت مقایسه نقطه به نقطه داده های انحلال از تست ANOVA استفاده شد که با توجه به مقادیر p value در تمام نقاط روند انحلال داروی بلوری و Fen@ZIF-8 تفاوت معنی دار نشان دادند ($p < 0.05$). از معیار DE% در زمانهای ۵، ۲۰ و ۴۵ دقیقه برای ارزیابی عملکرد انحلال نمونه ها استفاده شد. نتایج نشان داد که در مقایسه با داروی بلورین فنوفیبرات میزان DE% در فرمولاسیون Fen@ZIF-8 در تمام زمان های آزمایش شده به طرز چشمگیری بالاتر بود، یافته ای که می تواند به عدم فاز بلوری این دارو در این فرمولاسیون نسبت داده شود. عامل دیگر توصیف پروفایل های انحلال MDT است. محاسبات نشان داد که MDT نیز کاهش یافته که نشانگر این واقعیت است که دارو در حامل چارچوب های امیدازولی ژنوتیپی بارگیری شده است.

جدول ۱: خلاصه ای از پارامترهای مدل های کینتیکی داده های آزادسازی فنوفیبرات از نانوذرات

Model	K	R ²	AIC	MSC
Zero-order	K ₀ =1.705	-0.7708	96.5023	-2.1487
First-order	K ₁ =0.111	0.9019	67.5744	0.7441
Higuchi	K _h =13.389	0.5140	83.5718	-0.8557
First order with F _{max}	K ₁ = 0.164 F _{max} =88.734	0.9809	52.0058	2.3009
Hixson-Crowell	K _{Hc} =0.020	0.7003	78.7375	-0.3722
Weibull	α=1.630 β=0.342 T _i =701	0.9991	22.5238	5.2491
Korsmeyer-Peppas	K _{kp} =47.664 n=0.161	0.9875	47.8122	2.7203
Hopfenberg	K _{HB} =0.000 n=5923.208	0.8896	69.5769	0.5438

جدول ۲: مقایسه پارامترهای انحلال بین داروی فنوفیبرات و نانوذرات Fen@ZIF-8

Samples	f ₁	f ₂	DE t _{5min}	DE t _{20min}	DE t _{45min}	MDT (min)
Fen	-	-	0.23	1.20	1.94	27.87
Fen@ZIF-8	96.92	6.09	27.96	60.72	74.49	9.85

۷- نتیجه گیری

به طور خلاصه در این مطالعه عملکرد چارچوب های ایمیدازولی زئولیتی به عنوان یک حامل در بهبود انحلال فنوفیبرات به عنوان یک عضو از داروهای کلاس دو سیستم تقسیم بندی بیوفارماسیوتیکال با محلولیت ضعیف مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه پارامترهای انحلال (DE)، f₁، f₂ و MDT و نتایج انحلال نشان داد که میزان انحلال فنوفیبرات آزاد شده از ZIF-8 به طور قابل توجهی سریعتر از فنوفیبرات بلورین می باشد. بهبود انحلال ممکن است به برهمکنش های بین دارو و حامل و همچنین به دام افتادن دارو در حفرات حامل ارتباط داشته باشد. این اثرات می توانند حالت بلوری فنوفیبرات را به حالت بی شکل یا آمورف تغییر دهند. تبدیل از حالت بلوری به آمورف با تجزیه و تحلیل FT-IR و PXRD اثبات شد. علاوه بر این، تخریب حامل ZIF-8 در شرایط محیط شبیه ساز معده یک عامل اصلی کمک کننده است که باعث می شود انحلال دارو در این محیط بیشتر و بیشتر گردد. در مجموع، این مطالعه استفاده از چارچوب های ایمیدازولی زئولیتی را در بهبود فراهمی زیستی داروهای کم محلول در آب معرفی کرده و یک روش آسان، کم هزینه و بدون استفاده از پیوند های کووالانسی چند مرحله ای بوده که اهمیت آن را دو چندان می کند.

۸- قدردانی

این اثر توسط دانشگاه علوم پزشکی زنجان (A-12-968-2) پشتیبانی شده است. مؤلفان هیچ وابستگی یا مشارکت مالی دیگری با هر سازمان یا نهاد با منافع مالی یا درگیری مالی با موضوع یا مطالب مورد بحث در دست نوشته جدا از موارد فاش شده، ندارند.

۹- مراجع

- [1] Y. Kawabata, K. Wada, M. Nakatani, S. Yamada, S. Onoue, *International Journal of Pharmaceutics*. **420** (2011) 1.
- [2] A. Maleki, H. Kettiger, A. Schoubben, J.M. Rosenholm, V. Ambrogi, M. Hamidi, *Journal of Controlled Release*. **262** (2017) 329.
- [3] Y. Chen, Y. Lu, J. Chen, J. Lai, J. Sun, F. Hu, W. Wu, *International Journal of Pharmaceutics*. **376** (2009) 153.
- [4] L. Hu, H. Wu, F. Niu, C. Yan, X. Yang, Y. Jia, *International Journal of Pharmaceutics*. **420** (2011) 251.
- [5] P. Horcajada, T. Chalati, C. Serre, B. Gillet, C. Sebrie, T. Baati, J.F. Eubank, D. Heurtaux, P. Clayette, C. Kreuz, *Nature Materials*. **9** (2010) 172.
- [6] X. Unamuno, E. Imbuluzqueta, F. Salles, P. Horcajada, M. Blanco-Prieto, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **132** (2018) 11.
- [7] S. Rojas, T. Baati, L. Njim, L. Manchego, F. Neffati, N. Abdeljelil, S. Saguem, C. Serre, M.F. Najjar, A. Zakhama, *Journal of the American Chemical Society*. **140** (2018) 9581.
- [8] J. Zhuang, C.-H. Kuo, L.-Y. Chou, D.-Y. Liu, E. Weerapana, C.-K. Tsung, *ACS Nano*. **8** (2014) 2812.
- [9] C.A. McCarthy, W. Faisal, J.P. O'Shea, C. Murphy, R.J. Ahern, K.B. Ryan, B.T. Griffin, A.M. Crean, *Journal of Controlled Release*. **250** (2017) 86.
- [10] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, A. Zou, W. Li, C. Yao, S. Xie, *The AAPS Journal*. **12** (2010) 263.
- [11] Y. Fei, E.S. Kostewicz, M.-T. Sheu, J.B. Dressman, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **85** (2013) 1274.
- [12] P. Costa, J.M.S. Lobo, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **13** (2001) 123.
- [13] Y. Hu, H. Kazemian, S. Rohani, Y. Huang, Y. Song, *Chemical Communications*. **47** (2011) 12694.
- [14] K.E.A. AbouAitah, A.A. Farghali, A. Swiderska-Sroda, W. Lojkowski, A.M. Razin, M.K. Khedr, *J Nanomed Nanotechnol*. **7** (2016).